Aus dem Hallerianum Bern
Direktor: Prof. Dr. A. v. Muralt

Kolorimetrische und elektrometrische pH-Messung am Myosin

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der hohen Medizinischen Fakultät der Universität Bern

vorgelegt von

Josef Bermann
aus Bern

Buchdruckerei W. Friedli, Aarbergergasse 42, Bern
1943

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Auf Antrag des Herrn Prof. Dr. A. v. Muralt von der Medizinischen Fakultät zum Druck als Dissertation genehmigt.

Bern, den 4. März 1942

Der Dekan der medizinischen Fakultät

Einleitung

Zweck der vorliegenden Arbeit ist die Feststellung, wie gross die Fehler bei kolorimetrischer Messung des pH von Myosin in verschiedenen Versuchsreihen ist.

Es hat sich nämlich gezeigt, dass die kolorimetrischen pH-Messungen des Myosins keine genauen Resultate ergeben. Die Ursachen dieser Ungenauigkeiten sind folgende:

1. Eiweissfehler
2. Eigenfarbe (Haemoglobin) } des Myosins
3. Lichtstreuung

Diese Fehlerquellen fallen bei der elektrometrischen pH-Messung weg, so dass man das pH des Myosins erhält. Es wird daher der elektrometrisch gemessene pH-Wert als genau angesetzt und durch Vergleich mit dem kolorimetrisch gewonnenen Wert die Fehlergrösse unter verschiedenen Bedingungen ermittelt.

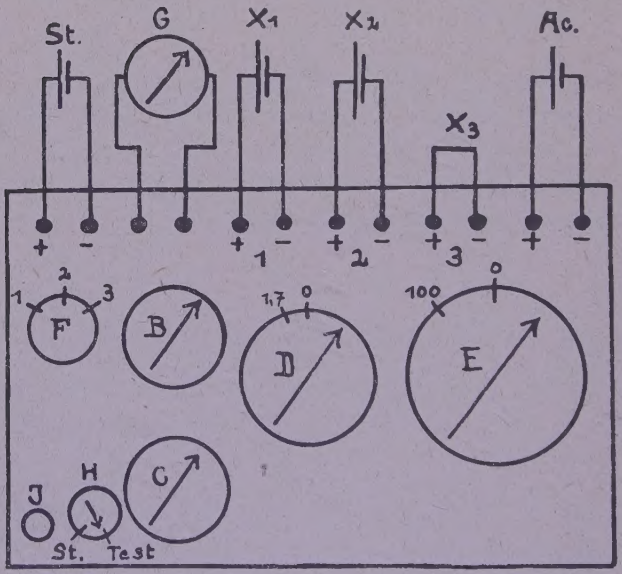
Methodik

1. Methoden der pH-Messung

A. Kolorimetrische Methode mit Indikatoren
Z. B. mit Phenolrot, Bromthymolblau, Phenolphthalein, Lakmus etc.

B. Elektrometrische (potentiometrische) pH-Bestimmungen (nach Michaelis) mit Wasserstoffelektrode

Aufbau der Apparatur



Bezeichnungen:

Ac = Akkumulator.
B = Vorschaltwiderstand (grobe Einstellung).
C = Vorschaltwiderstand (feine Einstellung).
B und C sind dem Ac vorgeschaltet um dessen Spannung auf diejenige des Standardelementes herabzusetzen.
D = Voltmeter-Messdraht (grobe Einstellung).

E = Voltmeter-Messdraht (feine Einstellung).
Mit D und E werden die Potentialdifferenzen der Elemente oder der unbekannten Elektroden gemessen.
Messbereich: D: 0—1,7 Volt. E: 0—100 Millivolt.

F = Umschalter auf 1, 2 oder 3.
1, 2, 3 sind Klemmen, an welche die Elektroden angeschlossen werden.

G = Galvanometer.

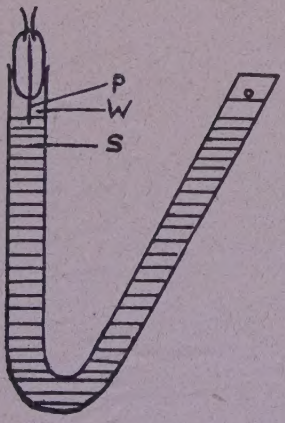
H = Umschalter: entweder auf Standardelement, um die Spannung des Akkumulators derjenigen des Standardelementes gleichzumachen, oder auf Test, um die Verbindung mit den Elektroden herzustellen um die Potentialdifferenz messen zu können.

J = Kontaktknopf, damit die Verbindung mit den betreffenden eingeschalteten Elektroden und dem Galvanometer hergestellt wird um Ausschlag messen zu können.

St = Standardelement.

$X_{1\ 2\ 3}$ = Elektroden:

a) Standardacetatelektrode mit Wasserstoff, U-förmig.



P = Platinierte Pt-elektrode
W = Wasserstoffblase
S = Standardacetat

Die Wasserstoffblase muss gut mit der Flüssigkeit durchmischt werden und zwar durch ca. 50 maliges Schwenken des U-Rohres.

Der Wasserstoff wird im Kipp'schen Apparat erzeugt und wie folgt gereinigt:
Kipp H → Sublimat → $KMnO_4$ → KOH → H
(Sublimat, $KMnO_4$ und KOH sind Waschflaschen).

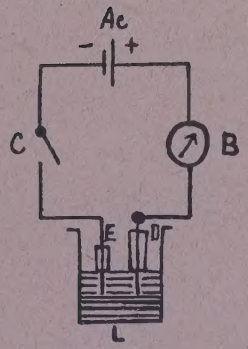
b) U-Elektrode mit Blut oder Serum.
Verdünnungslösung 0,85 % CO_2-freie NaCl-Lösung (CO_2-frei durch Kochen und Abkühlen unter Natronkalkverschluss).

Herstellung von Standardacetat

50 cm³ n/1 NaOH + 100 cm³ n/1 CH_3COOH + 350 cm³ H_2O gibt eine Lösung von 0,1 n Essigsäure + 0,1 n Natriumacetat (= Standardacetat). Das pH von Standardacetat = *4,62*.

Platinierung von Pt-Elektroden bei der U-förmigen H-Elektrode

Schaltung:



Ac = Akkumulator, 2 Volt
B = Ampèremeter
C = Schlüssel
D = Hilfselektrode
E = Zu platinierende Elektrode
L = Lösung

E wird zuerst mit konzentrierter Schwefelsäure gereinigt, mit dest. Wasser abgespült, dann eingesetzt. Die Lösung besteht aus 1 g Platinchlorid + 0,007 g Bleiacetat in 30 cm³ Wasser. Es bildet sich auf E eine Schicht von Platinschwarz.

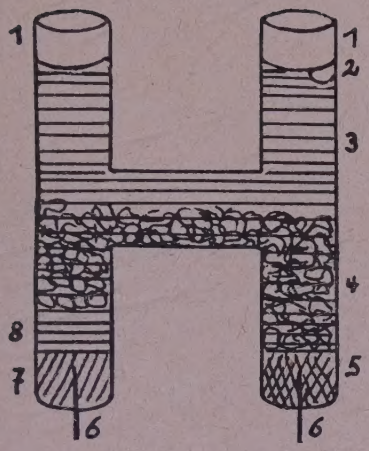
Ausreichende Platinierung: gebrauchte Elektrode 1 Minute
neue Elektrode 5 Minuten

Nachher wird E gewaschen und in neuen elektrolytischen Trog mit 5 % Schwefelsäure gebracht. Verfahren gleich wie vorher. Die so behandelten Elektroden werden in einem mit Aqua dest. gefüllten Gefäss aufbewahrt. Stromstärke: 0,003—0,004 Amp.

Selbsthergestelltes Normalelement

Zur Eichung des Potentiometers wird das *Normalelement* verwendet, das folgendermassen hergestellt wird:

Aufbau:



1 = Korken (mit Paraffin abgeschlossen)
2 = Luftblase (Ausdehnung!)
3 = $CdSO_4$ — Lösung
4 = $CdSO_4$ — Kristalle
5 = CdHg
6 = Pt — Draht
7 = Hg
8 = Paste

Materialien:

1. *Reines Hg.*
2. *Reines Cadmium* (Zinkfrei).
3. *Reines $CdSO_4$* und gesättigte Lösung derselben, ca. 50 cm^3. Die Lösung muss ein paar Tage vorher gemacht werden, da die Sättigung sehr langsam erfolgt.
4. *Merkurosulfat.* Dieses wird mit einigen cm^3 der $CdSO_4$ — Lösung gewaschen (3 x). Zum Schluss Lösung abgegossen.
5. *Cadmiumamalgam CdHg.* 2 g Cd mit 6—8 facher Gewichtsmenge Hg in Porzellanschale zusammengeschmolzen, noch flüssig in einen Schenkel des H-Gefässes gegossen (minus Pol), wo es erstarrt. Pt-Draht muss bedeckt sein.
6. *Paste.* Gewaschenes noch feuchtes Merkurosulfat + wenig Hg + wenig $CdSO_4$ — Lösung werden zu einem grauen Brei verrührt. Dieser Brei kommt in den andern Schenkel auf das Hg (plus Pol).

In die beiden Schenkel des H-Gefässes kommen nun $CdSO_4$ — Körner. Dann wird mit $CdSO_4$ — Lösung aufgefüllt und mit Korken verschlossen. Zum luftdichten Abschluss verwendet man Paraffin. In einem Schenkel wird eine kleine Luftblase gelassen, damit Ausdehnung möglich ist. Die E. M. K. dieses Normalelementes beträgt 1,0187 Volt.

Messungen: Gemessen wird die Potentialdifferenz zwischen Standardazetat und unbekannter Lösung, wobei dann die Potentialdifferenz in pH umgerechnet wird, wie es bei der später zu besprechenden

Chinhydronelektrode angegeben ist. Die Messung erfolgt mit einer n/10 unpolarisierbaren Kalomelektrode (mit Agarheber) als Gegenelektrode.

C. Elektrometrische Messungen mit der Chinhydronelektrode

Angewendet bei pH kleiner als 8,5.

Chinhydron ist eine Verbindung von 1 Mol Chinon + 1 Mol Hydrochinon, welches in wässeriger Lösung in seine Komponenten zerfällt. Platin zeigt gegen die Lösung, welche Chinhydron enthält, einen Potentialunterschied, der von der Chinhydronmenge und von der Wasserstoffionenkonzentration abhängt. Wenn Chinon zu Hydrochinon konstant 1:1 ist, dann kommt nur die H-ionenkonzentration in Betracht. Es kommt dabei nicht auf die Menge des Chinhydrons an.

Zur Messung wird eine galvanische Kette aus 2 Platinelektroden und aus 2 verschiedenen Lösungen mit der H-ionenkonzentration h_1 beziehungsweise h_2, welche beide etwas Chinhydron enthalten, hergestellt. Die elektromotorische Kraft (EMK) ist nun bei 18°:

$$EMK = 0{,}0577 \log \frac{h_1}{h_2} \quad \textit{Volt}$$

$$E = 57{,}7 \log \frac{h_1}{h_2} \quad \textit{Millivolt}$$

E = Potentialdifferenz in Millivolt

0,0577 ist ein von der Temperatur abhängiger Koeffizient

Tabelle:		
15°	:	0,0571
16°	:	0,0573
17°	:	0,0575
18°	:	0,0577 etc.

$$\frac{E}{57{,}7} = 10\,g\ h_1 - 10\,g\ h_2$$

$$\frac{E}{57{,}7} = pH_2 - pH_1 \quad (\text{da} - 10\,g\ h_2 = pH_2 \text{ und } 10\,g\ h_1 = -\,pH_1 \text{ ist})$$

bezogen auf Standardazetat $pH_1 = 4{,}62$

$$pH_2 = \frac{E}{57{,}5} + 4{,}62$$

Zusammenstellung der Versuchsmessungen

mit bekannten Mischungen von sekundärem und primärem Phosphat

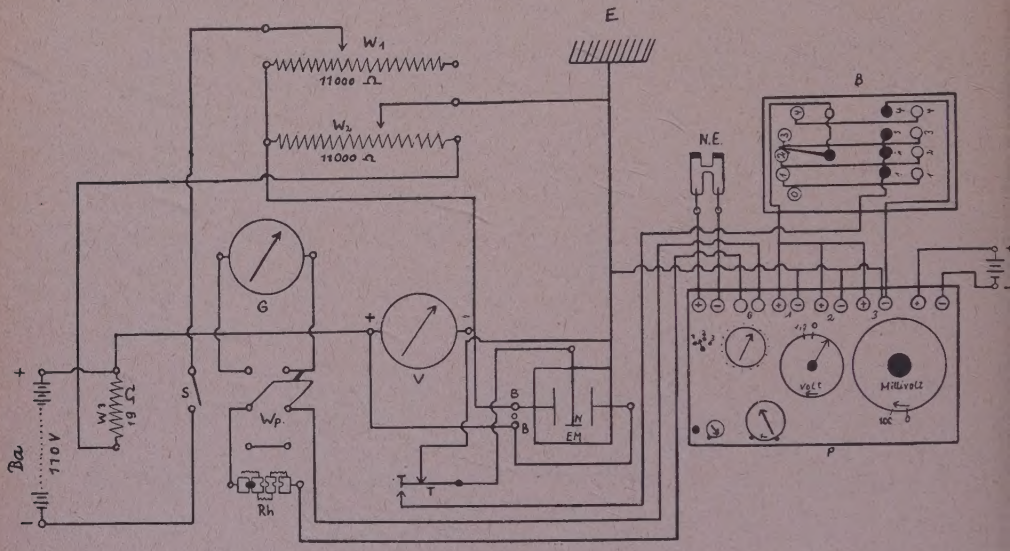
Puffergemisch prim.	sek.	I Wert laut Tabelle	II Chinhydr.-E. KCl-Schliff	III Chinhydr.-E. KCl-Agar-heber	IV Chinhydr.-E. über n/10 Kalomel-E.	V H-Elektr. über n/10 Kalomel-E.
1	9	pH : 5,910	5,879			
			5,883			
3	7	pH : 6,468	6,430	6,485	6,473	6,473
5	5	pH : 6,813	6,78	6,675	6,689	6,837
			6,811			

Die Werte unter den Kolonnen III, IV, V bei der Mischung 5 : 5 waren grösseren Schwankungen unterworfen.

Als Messapparatur wurde die unter 1. B. angegebene verwendet.

2. Methoden, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden

A. Apparatur zur Bestimmung des pH mit Elektrometer (Lindemann)



Bezeichnungen:

P	=	Buchsenkästchen
B	=	Potentiometer
NE	=	Normalelement
Acc	=	Akkumulator
E	=	Erde
EM	=	Elektrometer (Lindemann)
B	=	Binanten
T	=	Taster
V	=	Voltmeter
G	=	Galvanometer
Wp	=	Wippe
Rh	=	Rheostatwiderstand
S	=	Schlüssel
W_1 W_2 W_3	=	Widerstände
Ba	=	Batterie

Als Elektroden können Glas-, Wasserstoff- oder Chinhydronelektroden verwendet werden.

Die Messungen mit der oben angegebenen Apparatur ergaben schwankende Werte, da dieselbe nicht genug gegen äussere Störungen abgeschirmt werden konnte.

B. Beckmann pH-Meter

Mit diesem Apparat ergaben sich die genauesten Resultate. Die Messung erfolgt mittelst einer Glaselektrode und einer Kalomelektrode, die im Apparat eingebaut sind. Das pH wird über eine Elektrometerröhre in Kompensationsschaltung direkt gemessen.

3. Herstellung des Myosins

Lösungen:

I. 10 l H_2O
darin 894,7 g 1,2 mol KCl
13,6 g 0,01 mol KH_2PO_4
87,1 g 0,05 mol K_2HPO_4

II. 2 l H_2O
darin 2,72 g 0,01 mol KH_2PO_4
17,42 g 0,05 mol K_2HPO_4

III. 15 l H_2O redest.

Alle 3 Lösungen müssen eiskalt sein.

Verlauf des Versuches mit Kaninchen

Einem narkotisierten Kaninchen wird nach Eröffnung der Bauchdecke die Aorta abdominalis abgeklemmt, eine Kanüle in dieselbe eingeführt und mit 0,9 % NaCl — Lösung durchströmt. Die Aorta wird jetzt oberhalb der Kanüle durchgeschnitten. Die NaCl — Lösung fliesst in die Hinterbeine und entblutet diese allmählich, während das Blut bei der oberhalb der Kanüle durchschnittenen Aorta ausfliesst. Nach genügender Entblutung, die man an dem immer heller werdenden Blute erkennt, wird das Fleisch von den Hinterbeinen, nach vorheriger Enthäutung, weggeschnitten und möglichst rasch durch eine Fleischmaschine getrieben und in einen Topf mit der I. — Lösung eingebracht.

Ein elektrischer Rührer durchmischt im Kühlraum bei ca. 1° C nun ca. einen halben Tag lang das Fleisch mit der Lösung. Während dem Rühren muss das pH kontrolliert werden, entweder mit Phenolrot oder elektrometrisch. Das pH der Lösung sollte sich zwischen 7,5 bis 8,5 bewegen. Um das pH zu erhöhen giesst man von der II. Lösung zu.

Nach dem Rühren wird der Inhalt des Gefässes unter Pressen durch ein Tuch filtriert. Das Filtrat, welches Myosin, Myogen und Globulin X (Edsall) enthält, wird nun durch eine Pipette langsam in

die III. Lösung eingespritzt, wobei sich eine feine Wolke niederschlagen soll. Das Einspritzen erfolgt unter fortwährendem Rühren der Lösung mit dem elektrischen Rührer. Der grauweisse Niederschlag setzt sich nach gewisser Zeit (gewöhnlich genügt ein halber Tag im Kühlraum). Die darüberstehende klare Flüssigkeit wird abgegossen.

Der Niederschlag enthält hauptsächlich das Myosin. Um dieses noch reiner zu erhalten, wird der Niederschlag in der Kälte zentrifugiert und die oberhalbstehende Flüssigkeit abgesogen. Das Myosin zeigt sich jetzt in geleeartiger Form. Es wird mit etwas konz. KCl-Lösung aufgenommen und ein wenig Pufferlösung II. zügefügt.

Das Myosin löst sich in KCl und ist für die Messungen bereit. Aufbewahrt wird es im Eisschrank. Der ganze Versuch muss bei ca. 0° ausgeführt werden, da sonst das Eiweiss ausflockt.

Es hat sich bei der Ausführung des Versuches gezeigt, dass beim Kaninchen 15 l redest. H_2O zum Einspritzen nicht genügen und kein Niederschlag erfolgt. Erst bei 20 l ergab sich der Myosinniederschlag.

Myosinpräparation vom Hund

Der Verlauf der Präparation ist der gleiche wie bei den Kaninchen, nur muss in mindestens 25 l redest. Wasser eingespritzt werden. Auch hier wird das Fleisch der Hinterbeine benützt. Die Lösung ist stark hämoglobinhaltig, da viel mehr Blutgefässe vorhanden sind, wie bei den Kaninchen und diese deshalb nicht vollständig mit der 0,9 % NaCl — Lösung durchspült werden können. Auch findet sich viel Fett. Es ist dies aber für die Herstellung des Myosins nicht von Bedeutung, da beim Einspritzen und Zentrifugieren sich nur das Myosin setzt, das Hämoglobin sich aber in Lösung befindet, die abgesogen wird, und das Fett obenauf schwimmt und abgeschöpft werden kann.

Messungen

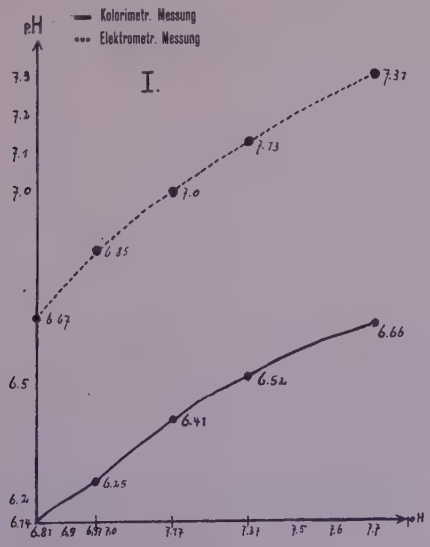
Vor jeder Messung mit dem pH-Meter von Beckmann wird dieses mit dem, von der Fabrik gelieferten, Standardpuffer von pH 3,98 geeicht und allfällige Abweichungen mit dem „Zero-Adjuster" korrigiert.

Als Indikator für die Indikatorenreihe wurde Bromthymolblau verwendet, und zwar wurden zu 20 ccm Phosphatpuffermischung 0,4 cm^3 Indikator zugegeben. Diese Lösung wurde mit dem pH-Meter geeicht und dann mit der Paraffin luftdicht abgeschlossen.

Messung mit Myosin

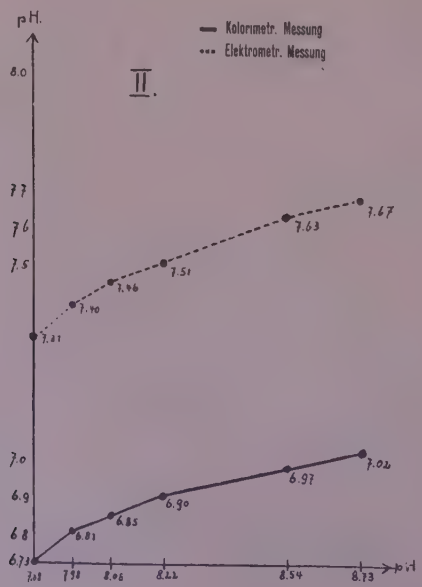
I. 1. III. Temperatur 22°

Mischung	Kolorimetr. Messung pH.	Elektrometr. Messung pH.	Differenz pH.
5 ccm Myosin + 5 ccm Puffer pH 6,81 + 0,2 ccm Indikator	6,14	6,67	0,63
5 ccm Myosin + 5 ccm Puffer pH 6,97 + 0,2 ccm Indikator	6,25	6,85	0,60
5 ccm Myosin + 5 ccm Puffer pH 7,17 + 0,2 ccm Indikator	6,41	7,0	0,59
5 ccm Myosin + 5 ccm Puffer pH 7,37 + 0,2 ccm Indikator	6,52	7,13	0,61
5 ccm Myosin + 5 ccm Puffer pH 7,7 + 0,2 ccm Indikator	6,66	7,31	0,65



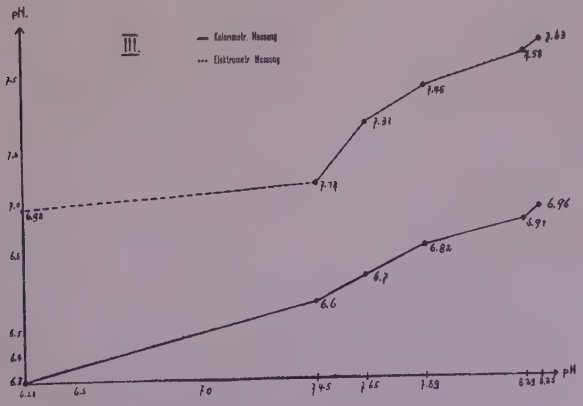
II. 4. III. Temperatur 24°

Mischung	Kolorimetr. Messung pH.	Elektrometr. Messung pH.	Differenz pH.
5 ccm Myosin + 5 ccm Puffer pH 7,88 + 0,2 ccm Indikator	6,73	7,31	0,58
5 ccm Myosin + 5 ccm Puffer pH 7,98 + 0,2 ccm Indikator	6,81	7,40	0,59
5 ccm Myosin + 5 ccm Puffer pH 8,08 + 0,2 ccm Indikator	6,85	7,46	0,61
5 ccm Myosin + 5 ccm Puffer pH 8,22 + 0,2 ccm Indikator	6,90	7,51	0,61
5 ccm Myosin + 5 ccm Puffer pH 8,54 + 0,2 ccm Indikator	6,97	7,63	0,66
5 ccm Myosin + 5 ccm Puffer pH 8,73 + 0,2 ccm Indikator	7,02	7,67	0,65



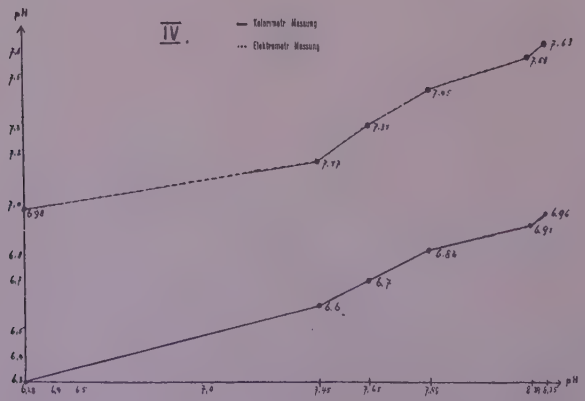
III. 14. III. Temperatur 22½°

Mischung	Kolorimetr. Messung pH.	Elektrometr. Messung pH.	Differenz pH.
5 ccm Myosin + 5 ccm KCl pH 6,28 + 0,2 ccm Indikator	6,3	6,98	0,68
5 ccm Myosin + 5 ccm Puffer pH 7,45 + 0,2 ccm Indikator	6,6	7,17	0,57
5 ccm Myosin + 5 ccm Puffer pH 7,65 + 0,2 ccm Indikator	6,7	7,31	0,61
5 ccm Myosin + 5 ccm Puffer pH 7,89 + 0,2 ccm Indikator	6,82	7,45	0,63
5 ccm Myosin + 5 ccm Puffer pH 8,29 + 0,2 ccm Indikator	6,91	7,58	0,67
5 ccm Myosin + 5 ccm Puffer pH 8,35 + 0,2 ccm Indikator	6,96	7,63	0,67



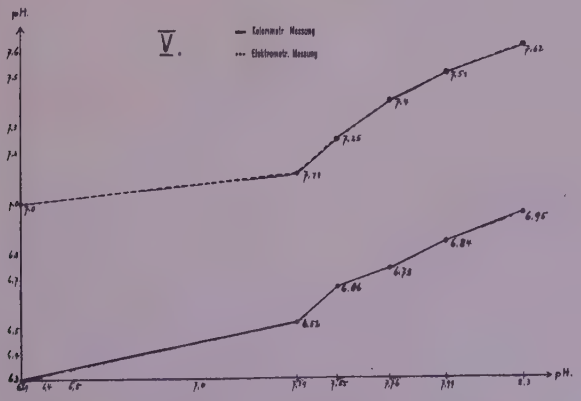
IV. 15. III. Temperatur 22½ °

Mischung	Kolorimetr. Messung pH.	Elektrometr. Messung pH.	Differenz pH.
5 ccm Myosin + 5 ccm KCl pH 6,28 + 0,2 ccm Indikator	6,3	6,98	0,68
5 ccm Myosin + 5 ccm Puffer pH 7,45 + 0,2 ccm Indikator	6,6	7,17	0,57
5 ccm Myosin + 5 ccm Puffer pH 7,65 + 0,2 ccm Indikator	6,7	7,31	0,61
5 ccm Myosin + 5 ccm Puffer pH 7,89 + 0,2 ccm Indikator	6,82	7,45	0,63
5 ccm Myosin + 5 ccm Puffer pH 8,29 + 0,2 ccm Indikator	6,91	7,58	0,67
5 ccm Myosin + 5 ccm Puffer pH 8,35 + 0,2 ccm Indikator	6,96	7,63	0,67



V. 15. III. Temperatur 23°

Mischung	Kolorimetr. Messung pH.	Elektrometr. Messung pH.	Differenz pH.
5 ccm Myosin + 5 ccm KCl pH 6,29 + 0,2 ccm Indikator	6,3	7,0	0,7
5 ccm Myosin + 5 ccm Puffer pH 7,39 + 0,2 ccm Indikator	6,52	7,11	0,59
5 ccm Myosin + 5 ccm Puffer pH 7,55 + 0,2 ccm Indikator	6,66	7,25	0,59
5 ccm Myosin + 5 ccm Puffer pH 7,76 + 0,2 ccm Indikator	6,73	7,4	0,67
5 ccm Myosin + 5 ccm Puffer pH 7,99 + 0,2 ccm Indikator	6,84	7,51	0,67
5 ccm Myosin + 5 ccm Puffer pH 8,3 + 0,2 ccm Indikator	6,95	7,62	0,67



16. III.

Vorhandenes Myosin neuerdings eingespritzt: 200 cm^3 Myosin in 2 l redest. H_2O.

17. III.

Lösung oberhalb Myosin abgesogen. Myosin zentrifugiert: Myosin in gallertartiger, weisser Form. Versetzt mit KCl konz.

18. III.

Myosin nochmals eingespritzt: 100 cm^3 Myosin in 2 l redest. Wasser.

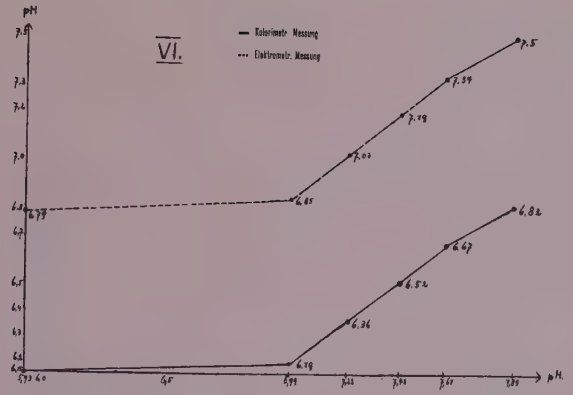
19. III.

Zentrifugiert. Myosin mit KCl im Verhältnis 1 : 8 versetzt. Technik: Wiegen der Zentrifugengläser vor und nach dem Zentrifugieren.

VI. 25. III. Temperatur 21°

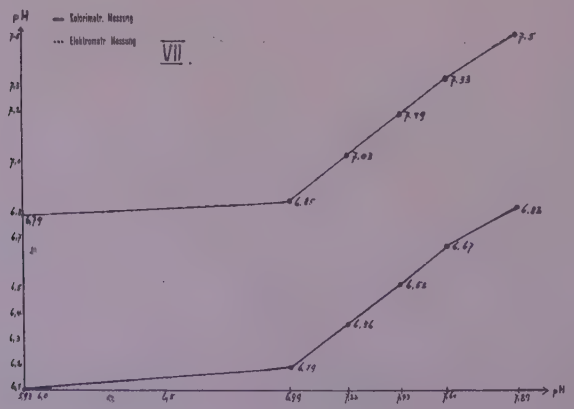
Mischung	Kolorimetr. Messung pH.	Elektrometr. Messung pH.	Differenz pH.
5 ccm Myosin + 5 ccm KCl pH 5,93 + 0,2 ccm Indikator	6,15	6,79	0,64
5 ccm Myosin + 5 ccm Puffer pH 6,99 + 0,2 ccm Indikator	6,19	6,85	0,66
5 ccm Myosin + 5 ccm Puffer pH 7,22 + 0,2 ccm Indikator	6,36	7,03	0,67
5 ccm Myosin + 5 ccm Puffer pH 7,43 + 0,2 ccm Indikator	6,52	7,19	0,67
5 ccm Myosin + 5 ccm Puffer pH 7,61 + 0,2 ccm Indikator	6,67	7,34	0,67
5 ccm Myosin + 5 ccm Puffer pH 7,89 + 0,2 ccm Indikator	6,82	7,50	0,68

Die Mischung 5 cm³ Myosin + 5 cm³ KCl + 0,2 cm³ Indikator gibt eine Ausflockung, da zu sauer. Dabei war das pH von KCl 5,93 und das von Myosin 6,87.



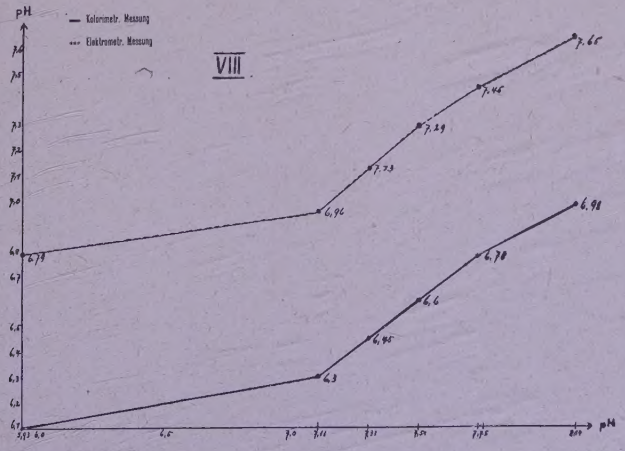
VII. 25. III. Temperatur 22½° 1500

Mischung	Kolorimetr. Messung pH.	Elektrometr. Messung pH.	Differenz pH.
5 ccm Myosin + 5 ccm KCl pH 5,93 + 0,2 ccm Indikator	6,1	6,79	0,69
5 ccm Myosin + 5 ccm Puffer pH 6,99 + 0,2 ccm Indikator	6,19	6,85	0,66
5 ccm Myosin + 5 ccm Puffer pH 7,22 + 0,2 ccm Indikator	6,36	7,03	0,67
5 ccm Myosin + 5 ccm Puffer pH 7,43 + 0,2 ccm Indikator	6,52	7,19	0,67
5 ccm Myosin + 5 ccm Puffer pH 7,61 + 0,2 ccm Indikator	6,67	7,33	0,66
5 ccm Myosin + 5 ccm Puffer pH 7,89 + 0,2 ccm Indikator	6,82	7,5	0,69



VIII. 25. III. Temperatur 22½ ° 1600

Mischung	Kolorimetr. Messung pH.	Elektrometr. Messung pH.	Differenz pH.
5 ccm Myosin + 5 ccm KCl pH 5,93 + 0,2 ccm Indikator	6,1	6,79	0,69
5 ccm Myosin + 5 ccm Puffer pH 7,11 + 0,2 ccm Indikator	6,3	6,96	0,66
5 ccm Myosin + 5 ccm Puffer pH 7,31 + 0,2 ccm Indikator	6,45	7,13	0,68
5 ccm Myosin + 5 ccm Puffer pH 7,51 + 0,2 ccm Indikator	6,6	7,29	0,69
5 ccm Myosin + 5 ccm Puffer pH 7,75 + 0,2 ccm Indikator	6,78	7,45	0,67
5 ccm Myosin + 5 ccm Puffer pH 8,14 + 0,2 ccm Indikator	6,98	7,65	0,67



Zusammenfassung

Die Differenzen zwischen der kolorimetrischen und der elektrometrischen pH-Messung zeigen einen Wert, welcher zwischen pH 0,61 und 0,69 schwankt. Daneben gibt es einige wenige Resultate, die unter pH 0,61 oder über pH 0,69 hinausgehen. Der ausgerechnete Mittelwert aller Versuchsreihen ist auf 2 Stellen aufgerundet *pH 0,65*. Die graphische Darstellung der einzelnen Versuchsreihen ergibt eine Parallelität der Kurven mit steigendem pH der Puffer-Myosin-Mischung. Es zeigt sich also, dass bei einer kolorimetrischen pH-Messung mit Myosin am abgelesenen pH ein Zuschlag von pH 0,65 gemacht werden muss um das richtige pH des Myosins zu erhalten.

Literatur

Michaelis L. u. Rona P.: Praktikum der physikalischen Chemie (1930).
Edsall J. T.: J. of biol. Chem. 89. 289. (1930).
Muralt A. v. u. Edsall J. T.: J. of. biol. Chem. 89. 315. (1930).
Weber H. H.: Biochem. Z. 158. 443. (1925).
Weber H. H.: Biochem. Z. 158. 473. (1925).
Weber H. H.: Biochem. Z. 189. 381. (1927).
Weber H. H.: Biochem. Z. 189. 407. (1927).
Weber H. H.: Biochem. Z. 218. 1. (1930).
Howe P. E.: J. of. biol. Chem. 61. 493. (1924).
Meyer K.: Biochem. Z. 266. 137. (1933).
Stöver R.: Biochem. Z. 259. 269. (1933).
Brown: J. Am. Chem. Soc. 56. 646. (1934).